

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 5 5 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 3 月 1 5 日
氏 名	長谷川 智 彦		
論文題目	The differential expression patterns of messenger RNAs encoding Nogo-A and Nogo-receptor in the rat central nervous system (ラット中枢神経系における Nogo-A 及び Nogo 受容体 mRNA の発現分布の差異)		

博士(医学) 長谷川 智 彦

論文題目

The differential expression patterns of messenger RNAs encoding Nogo-A and Nogo-receptor in the rat central nervous system

(ラット中枢神経系におけるNogo-A及びNogo受容体mRNAの発現分布の差異)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

神経損傷後の過程において、末梢神経系では軸索の再生が起こるが、中枢神経系では再生が制限される。このことは临床上でも脳、脊髄損傷等の中枢神経損傷患者において機能改善障害の一因として大きな問題である。中枢神経系において軸索再生が制限される要因の一つとしてNogo-Aの存在があげられている。Nogo-Aはミエリンに存在する神経軸索伸長阻害蛋白として発見され、中枢神経系のオリゴデンドロサイトには存在するが、末梢神経のシュワン細胞には存在しない。Nogo-Aの構造は、細胞質内に存在するN末側(N-nogo)、C末側(C-nogo)と細胞外に存在する66個のアミノ酸からなるループ(Nogo-66)の3つの機能的部位からなる。近年、Nogo-66に対する受容体(Nogo-R)が同定され、Nogo-AはNogo-Rを介し、細胞骨格を調節することによって、軸索再生を阻害していると考えられている。

Nogo-AとNogo-Rの発現分布については過去にも報告がある。しかし、それらの報告では、ある限られた部位における発現の検討しかなされておらず、さらに、発現部位についても意見が別れている。よって今回、中枢神経系全体におけるNogo-Aとその受容体の役割と発現動態を知るために、より広範囲で詳細なNogo-A及びNogo-R mRNAの発現分布の検討を行った。

〔材料ならびに方法〕

約150gのWistar種雄性ラット6匹を麻酔下に断頭し、脳、脊髄を採取、直ちに凍結した。脳全体での詳細な分布を調査するため、200 μ mおきの冠状断面で切片を作成し、35Sで標識した、Nogo-A、Nogo-Rを特異的に認識する合成オリゴヌクレオチドプローブを用い、in situハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの信号強度は、銀粒子の集積の程度により4段階に分類した。

〔結果〕

1. Nogo-A mRNAは中枢神経系の殆ど全てのグリア細胞、神経細胞で発現した。

Nogo-A mRNAはオリゴデンドロサイトのみならず、ほぼ全ての脳、脊髄の神経細胞で発現が見られた。特に嗅球、海馬、大脳皮質、視床、視床下部、黒質、赤核、青斑核、蝸牛神経核、前庭神経核、動眼神経核、舌下神経核、橋核、小脳核、小脳皮質、脊髄前角の神経細胞では強い発現が見られた。

2. Nogo-R mRNAは限局した神経細胞のみに発現した。

Nogo-R mRNAはグリア細胞では発現が見られなかった。発現部位で対比染色を行い、詳細に観察したところ、嗅球の僧帽細胞、海馬の錐体細胞、扁桃核、大脳皮質、視床の一部、内側手綱核、小脳顆粒細胞などの限局した部位の神経細胞において発現が見られたが、中脳レベルより下位の脳幹および脊髄では殆ど発現が見られなかった。

〔考察〕

1. Nogo-A mRNAはオリゴデンドロサイトだけでなく、中枢神経系の殆ど全ての神経細胞に発現していた。そのことは、Nogo-Aが神経細胞にとって基本となる重要な蛋白である可能性を示唆している。その作用については、培養神経細胞においてNogo-Aが突起の分岐部、結節状構造やシナプスに存在するとの報告があることをあわせると、神経細胞に存在するNogo-Aは軸索成長、誘導、他の軸索との相互作用に関与しているのではないかと推察した。
2. 一方、Nogo-R mRNAの発現は一部の神経細胞に局限しており、かつ小脳Purkinje細胞、小脳核、脳幹の神経核や脊髄では過去の報告と異なっていた。過去の報告では、今回のオリゴヌクレオチドプローブと異なり、RNAプローブを用いており、プローブの特異性の違いにより、結果に相違がでたと思われる。
3. 嗅球の僧帽細胞や海馬の錐体細胞等の投射神経細胞において、Nogo-R mRNAの発現が強く見られたが、嗅球の傍糸球体細胞や海馬の介在細胞等の高い可塑性を有すると考えられる介在神経細胞では存在しないことから、Nogo-Rの有無が可塑性に関与する可能性が示唆された。
4. 腹側被蓋領域、青斑、縫線核に存在する高い再生能力を持つとされるモノアミン作動性の神経細胞や他の視床皮質投射神経細胞に比べ高い軸索再生能を有する視床網様核の神経細胞にはNogo-R mRNA発現が見られなかった。このことより、高い軸索再生能を持つ神経細胞においてはNogo-Rが存在しないと推察された。

〔結論〕

中枢神経系におけるNogo-A mRNAは、オリゴデンドロサイトのみならず、殆ど全ての神経細胞で発現が見られ、神経細胞にとって重要な役割を果たす可能性が示唆された。一方、高い可塑性、軸索再生能を持つ神経細胞ではNogo-R mRNAの発現が見られず、Nogo-Rの有無が神経の軸索再生能、可塑性に関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

神経損傷後の修復過程において、末梢神経系では軸索の再生が起こるが、中枢神経系では再生が制限され、中枢神経損傷における機能改善障害の一因と考えられている。ミエリンに存在する神経軸索伸長阻害蛋白であるNogo-Aは中枢神経系のオリゴデンドロサイトには存在するが、末梢神経のシュワン細胞には存在せず、これが中枢神経系における軸索再生の制限の要因の一つとされる。また近年、Nogo-Aに対する受容体(Nogo-R)が同定され、Nogo-AはNogo-Rを介し、細胞骨格を調節することによって、軸索再生を阻害していると考えられている。以上よりNogo-AとNogo-Rの発現分布を調べることは中枢神経系の修復機序を解明する上で興味深い。申請者らはNogo-Aとその受容体の発現状態を知るために、ラット(雄性Wistar系ラット、n=6)の脳から脊髄にいたる全中枢神経系におけるNogo-AおよびNogo-R mRNAの分布をin situハイブリダイゼーション法により検討した。

Nogo-A mRNAの発現はオリゴデンドロサイトのみならず、中枢神経系のほとんど全てのグリア細胞と神経細胞でみられた。特に嗅球、海馬、大脳皮質、視床、視床下部、黒質、赤核、青斑核、蝸牛神経核、前庭神経核、動眼神経核、舌下神経核、橋核、小脳核、小脳皮質、脊髄前角の神経細胞での発現が強かった。一方、Nogo-R mRNAの発現は一部の神経細胞のみに局限しており、グリア細胞では発現が見られな

かった。対比染色により詳細に検討したところ、嗅球の僧帽細胞、海馬の錐体細胞、扁桃体、大脳皮質、視床の一部、内側手綱核、小脳顆粒細胞などで発現が見られ、中脳レベルより下位の脳幹および脊髄ではほとんど発現が見られなかった。小脳Purkinje細胞、小脳核、脳幹の神経核、脊髄で発現がみられないことは過去の報告と異なっていたが、これは用いたオリゴヌクレオチドプローブの違いによるものと思われた。

Nogo-A mRNAは中枢神経系の細胞で普遍的に発現していることより、Nogo-Aは神経細胞にとって基本となる重要な蛋白であると考えられた。一方、Nogo-R mRNAの発現は嗅球の僧帽細胞や海馬の錐体細胞では強かったが、高い可塑性を有することが知られている嗅球の傍糸球体細胞や海馬の介在細胞では発現は低く、Nogo-Rの発現を調節することにより神経の可塑性や軸索再生を制御していることが示唆された。また相対的に高い再生能力を持つとされる腹側被蓋領域、青斑、縫線核のモノアミン作動性の神経細胞や視床網様核の神経細胞ではNogo-R mRNA発現が低いこともこの仮説に矛盾しない。

中枢神経系におけるNogo-A mRNAは、オリゴデンドロサイトのみならず、殆ど全ての神経細胞で発現が見られ、神経細胞にとって重要な役割を果たす可能性が示唆された。一方、高い可塑性、軸索再生能を持つ神経細胞ではNogo-R mRNAの発現が見られず、Nogo-Rの有無が神経の軸索再生能、可塑性に関与することが示唆された。

審査委員会では、申請者らがNogo-AおよびNogo-R mRNAの分布の差異を調べることにより、オリゴデンドロサイトに発現されるNogo-Aが軸索再生を制限しているとする従来の考えとは異なり、Nogo-Rの発現の有無が神経の可塑性や軸索再生を制御している可能性を示したことを高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) Nogo-Rの発現は大脳皮質のどの層に多いか
- 2) Nogo-Rは細胞のどの部分に発現しているか
- 3) Nogo-Rの他の臓器での発現はどうか
- 4) 発生、老化に伴うNogo-AおよびNogo-Rの発現の変化はどうか
- 5) 他の霊長類におけるNogo-AおよびNogo-Rの発現はどうか
- 6) 蛋白レベルでの解析はどうか
- 7) 内側手綱核の機能は何か
- 8) Nogo-A上のNogo-R結合部位であるNogo-66に対するプローブは作成したか
- 9) アンチセンスcDNAの結果について
- 10) 他のミエリン由来軸索再生阻害タンパク質の発現はどうか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文に相応しいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	難 波 宏 樹		
	副査	堀 内 健太郎	副査	宮 嶋 裕 明